

XP-002211867

AN - 1992-188063 [30]
 A - [001] 014 028 04- 074 076 086 147 198 231 240 250 31- 336 501 525 575
 583 589 62- 645 688 720 724 023 061 127 158 200 201 202 251 258 267 276
 AP - JP19900239387 19900910; [Previous Publ. JP4121187] ; JP19900239387
 19900910
 CPY - NIHA
 DC - A96 B04 D16
 FS - CPI
 IC - A61K37/54 ; A61K38/46 ; A61P35/00 ; C12N9/78 ; C12N15/09 ; C12N15/55
 KS - 0013 0231 0619 1279 1588 2002 2014 2022 2512 2585 2675 2766
 MC - A10-E01 A12-V01 B04-B02C3 B04-C03C B12-G07 D05-A01A2 D05-A01B3
 M1 - [01] F012 F014 F016 F580 H5 H522 H589 H8 M210 M211 M272 M282 M312 M323
 M332 M342 M383 M393 M423 M510 M521 M530 M540 M710 M903 M904 P633 V802
 V814; 00212; 9223-17201-N
 PA - (NIHA) NIPPON MINING CO
 PN - JP3209338B2 B2 20010917 DW200161 C12N9/78 010pp
 - JP4121187 A 19920422 DW199223 C12N9/78 006pp
 PR - JP19900239387 19900910
 XA - C1992-085826
 XIC - A61K-037/54 ; A61K-038/46 ; A61P-035/00 ; C12N-009/78 ; C12N-015/09 ;
 C12N-015/55 ; (C12N-009/78 C12R-001/01) ; (C12N-009/78 C12R-001/01)
 AB - J04121187 Polyethylene glycol (PEG) modified arginine deaminase (I)
 which is chemically modified with PEG or its deriv. is new. It is
 prepd. by covalent bonding arginine deiminase and PEG or its deriv.
 High blood stable anticancer drug which contains PEG modified arginine
 deaminase as an active component.
 - Pref. (I) is of formula (A) (where AD is arginine daiminase, n is opt.
 numerical No. of av. mw. of PEG 1000-10000). Arginine deiminase has
 physico-chemical properties of (a) it hydrolysates amidino gp. of
 L-arginine to form L-citrulline and ammonia, (b) optimum pH 6.0-7.5,
 (c) stable pH 4.5-9.0, (d) optimum temp. ca 50 deg.C, (e) km value ca
 0.2 mM, (f) pl ca 4.7, (g) mw. ca 45000 (SDS-polyacrylamide gel E.P.),
 ca 90000 (gel filtration HPLC).
 - USE/ADVANTAGE - The cpd. has equal anticancer effect as that of
 arginine deiminase, the blood stability is raised, antigenicity is
 reduced, furthermore it is low toxic, it can be used for an anticancer
 drug, advantageously.
 - (e used)
 C - C12N9/78 C12R1/01
 - C12N9/78 C12R1/01
 CN - 9223-17201-N
 IW - POLYETHYLENE GLYCOL MODIFIED ARGININE DEAMINASE PREPARATION COVALENT
 BOND ARGININE POLYETHYLENE GLYCOL USEFUL ANTICANCER DRUG
 IKW - POLYETHYLENE GLYCOL MODIFIED ARGININE DEAMINASE PREPARATION COVALENT
 BOND ARGININE POLYETHYLENE GLYCOL USEFUL ANTICANCER DRUG
 NC - 001
 OPD - 1990-09-10
 ORD - 1992-04-22
 PAW - (NIHA) NIPPON MINING CO
 RRL - 00212
 TI - Polyethylene glycol modified arginine deaminase prepn. - by covalently

bonding arginine deiminase and ethylene] glycol, useful as anticancer drug

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-121187

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)4月22日

C 12 N 9/78
A 61 K 37/54
// C 12 N 15/55
(C 12 N 9/78
C 12 R 1:01)

ZNA
ADU

7823-4B
8317-4C

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 8 (全6頁)

⑭ 発明の名称 ポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼおよびその製造法

⑯ 特 願 平2-239387

⑰ 出 願 平2(1990)9月10日

⑱ 発 明 者 高 久 春 雄 埼玉県戸田市新曽南3丁目17番35号 日本鉱業株式会社内
⑲ 出 願 人 日本鉱業株式会社 東京都港区虎ノ門2丁目10番1号
⑳ 代 理 人 弁理士 藤野 清也

明 細 書

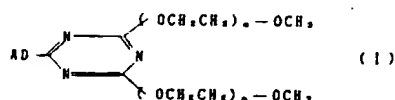
1. 発明の名称

ポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼおよびその製造法

2. 特許請求の範囲

(1) ポリエチレングリコールまたはその誘導体により化学修飾されたポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(2) 式(1)



で表される請求項(1)記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(式中、ADはアルギニンデイミナーゼを表し、nはポリエチレングリコールの平均分子量が1,000～10,000となる任意の正の整数を表す)

(3) アルギニンデイミナーゼが次の理化学的性質

を有する請求項(1)または(2)に記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(イ) L-アルギニンのアミノ基を加水分解してL-シトルリンとアンモニアを生成する

(ロ) 至適pH: 6.0～7.5

(ハ) 安定pH: 4.5～9.0

(ニ) 至適温度: 約50℃

(ホ) 分子量: 約0.2MD

(ヘ) 等電点(pI): 約4.7

(ト) 分子量: 約45,000
(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)

: 約90,000
(ゲル濾過BPLC法による)

(4) アルギニンデイミナーゼがマイコプラズマ・アルギニイニ(*Mycoplasma arginini*)由来のものである請求項(1)～(3)のいずれかに記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼ

(5) アルギニンデイミナーゼが第1図のアミノ酸

配列を含有するものである請求項(1)~(4)のいずれかに記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデヒミナーゼ

(6) アルギニンデヒミナーゼとポリエチレングリコールまたはその誘導体とを反応させて両者を共有結合させることを特徴とするポリエチレングリコール修飾アルギニンデヒミナーゼの製造法

(7) ポリエチレングリコール誘導体として2,4-ビス(ο-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-ε-トリアジンを用いることを特徴とする請求項(5)に記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデヒミナーゼの製造法

(8) 請求項(1)~(4)のいずれかに記載のポリエチレングリコール修飾アルギニンデヒミナーゼを有効成分とする血中安定性の高い制癌剤

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規かつ有用なポリエチレングリコ

ール修飾アルギニンデヒミナーゼ、およびその製造法に関する。さらに本発明はこのポリエチレングリコール修飾アルギニンデヒミナーゼを有効成分とする血中安定性の高い制癌剤に関する。

(従来の技術)

近年、遺伝子工学の進歩やタンパク質を大量精製する技術の向上により、酵素や生理活性物質などを医薬として使用する事が可能となった。癌治療の分野においても、癌細胞の栄養要求性に基づいた酵素療法(Nature誌、229、168(1971)、Br. J. Cancer誌、19、379(1965))が注目されている。アルギニンデヒミナーゼ(EC3.5.3.6)は、癌細胞の増殖に必須であるL-アルギニンをL-シトルリンとアンモニアに加水分解することにより、in vitroにおいて強い癌増進作用を示すことが知られている(Cancer Res誌、in press)。しかしながら、アルギニンデヒミナーゼには、酵素療法における固有な性質としての循環血液中からの急速な消失(クリアランス)の問題と、異種

タンパク質としての抗原性の問題が予想されている。

(発明が解決しようとする課題)

本発明はアルギニンデヒミナーゼのこのような欠点を解決するためになされたものであって、アルギニン分解能を保持し、血中安定性を向上させたアルギニンデヒミナーゼの化学修飾体を製造し、これを制癌剤として利用しようとするものである。

(課題を解決するための手段)

本発明者らは、アルギニンデヒミナーゼの化学修飾に使用する至適な合成高分子の探索研究を行った。

その結果、ポリエチレングリコールで化学修飾したアルギニンデヒミナーゼが優れた性質を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。

ポリエチレングリコールは、それ自体毒性が低く、免疫原性がなく、また、水溶液中で酵素の立体構造に影響を与えないので酵素活性を保持する修飾試薬である。とりわけ、平均分子量1,000、

~10,000の該修飾試薬は該酵素の安定化と免疫原性の抑制に優れた効果を発揮することがわかった。

また、該修飾体は次の方法によって調製される。

アルギニンデヒミナーゼは、いかなる生物由来のものを使用してもよい。たとえば、マイコプラズマ、シェードモナス、ストレプトコッカス等の微生物を例に挙げることができる。特に好適な菌株は、細胞研究所から入手することができるマイコプラズマ アルギニニ(M.arginini) [IFO 14476、ATCC23838 またはNCTC10129]である。

本発明のアルギニンデヒミナーゼは上記マイコプラズマの菌体抽出液から、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等のカラムクロマトグラフィーによってアルギニンデヒミナーゼを分離精製することができる。また、遺伝子工学的手法を用いて生産することもできる。

本発明に用いられる特に好ましいアルギニンデヒミナーゼの一つは次の理化学的性質を有する。

(イ) 作用

L-アルギニンのアミノ基を加水分解してL-シトルリンとアンモニアを生成する。

(ロ) 至適pH: 6.0~7.5

(ハ) 安定pH: 4.5~9.0

(ニ) 至適温度: 約50℃

(ホ) K_m値: 約0.2mM

(ヘ) 等電点(pI): 約4.7

(ト) 分子量: 約45,000
(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による)

: 約90,000
(ゲル濾過 HPLC法による)

(チ) N末端からのアミノ酸配列

Ser-Val-Phe-Asp-Ser-Lys-Phe-Lys-Gly-

Ile-His-Val-Tyr-Ser-Glu-

さらに、このアルギニンデヒミナーゼは第1図に示すアミノ酸配列を含有する。

また、修飾に使用するポリエチレングリコール(PEG)は、蛋白質と共有結合しうるものであれば、

いかなるものを用いてもよい。例えば、末端にカルボキシル基を有するポリエチレングリコールとN-ヒドロキシスクシンイミドとをカルボジイミドを用いて脱水結合して得られる活性化PEGなどが挙げられる。特に好適なものは、塩化シアヌル(2,4,6-トリクロロ-s-トリアジン)に2つのポリエチレングリコール(平均分子量約5000)鎖を結合させた活性型PEG₂(2,4-ビス(オ-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン)である。該活性型PEG₂は常法に従い、合成・精製される。

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニンデヒミナーゼは上記の活性型PEG₂のトリアジン環と、前記のアルギニンデヒミナーゼの分子表面に存在するアミノ基とを結合させることにより得ることができる。

尚、該修飾体の制癌活性は未修飾アルギニンデヒミナーゼと同等である。

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニ

ンデヒミナーゼは、試験例に示すように、優れた血中安定性を有することから、制癌剤として有用である。

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニンデヒミナーゼは、通常の製剤用担体、賦形剤あるいは希釈剤等を用いて慣用の方法で製剤とすることができる。この剤型としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤等として経口投与したり、あるいは静注、筋注、動注等の注射剤の形として投与したり、また坐剤の形にして投与したりすることができる。

投与量は、症状や投与対象者の年齢、性別等を考慮して個々の場合に応じて適宜決定されるが、通常成人1日当り10~500mgであり、これを1日1回または数回に分けて投与する。

該修飾体の毒性については、これをマウスに経口的あるいは尾静脈内に1g/kg投与しても死亡例がなく、また投与後解剖した所見によると各臓器には何等の異常が観察されず、きわめて安全で

あることが分かった。

また、抗原性試験の結果、モルモットにおいて抗体生産性は著しく抑制され、免疫原性を減少していることがわかった。

実施例

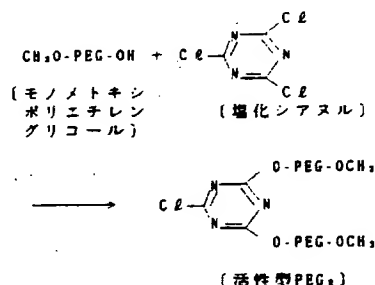
次に、本発明を実施例を示して具体的に説明する。

実施例1

ポリエチレングリコール(PEG)-修飾アルギニンデヒミナーゼの調製

(I) 2,4-ビス(オ-メトキシポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性型PEG₂)の合成法

特開平 4-121187 (4)



無水炭酸ナトリウム (10 g) とモレキュラー
シーヴ 3A (5 g) を含む乾燥ベンゼン 100 ml
にモノメトキシポリエチレングリコール (平均分
子量 5000) (20 g) と塩化シアヌル (365 mg)
を添加し、80℃ で 48 時間運流した。次に反応
液に石油エーテル 200 ml を添加し、生成した活
性型 PEG を沈殿させた。この沈殿物を、ベンゼン
- アセトン (1:1) 200 ml に溶解し、石油エ
ーテル 200 ml で沈殿させる精製操作を 3 回繰り
返し、さらにゲル濾過カラムクロマトグラフィー
により一本鎖の活性型 PEG を除去したのち、凍結

通常用いられるカラムクロマトグラフィー（ゲル透過、陰イオン交換、アルギニン・アフィニティカラム）を行うことにより、アルギニン・デイミナ、 0.32μ を得た。

このときの結果を第1表に示す。

精製工程	総蛋白 (g)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収 率 (%)
菌体抽出液	1.36	1.63×10^4	12.0	(100)
Sephacryl S-300HR	0.61	1.60×10^4	26.2	98
DEAE- Toyopearl 650s	0.38	1.47×10^4	38.7	90
Arginine- Sephrose 4B	0.32	1.41×10^4	44.5	86

このアルギニンデヒミナーゼは、前記した理化学的性質を有し、第1図に示したアミノ酸配列を有していた。

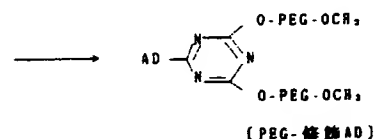
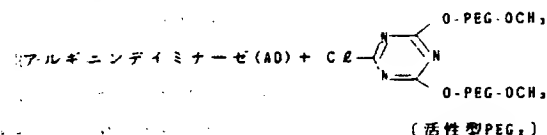
乾燥して活性型PEG, (10.3e)を得た。

(2) アルギニンデイミナーゼの調製

マイコプラズマ・アルギニニ (*M. arginini*) (IFO 14476株) を 30 ℓ 培養液 (PPL0 broth w/o CV (Difco) 21 g、L-アルギニン 10 g、馬血清 200 ㎖、2.5% 新鮮イーストエキス 100 ㎖、0.4% フェノールレッド液 5 ㎖ 及び 蒸留水 700 ㎖ の組成よりなり、pH 7.0 に調整) に接種し、5% CO₂ インキュベーター内で 37℃ において 2 日間静置培養した。次に得られた培養液を 7000rpm で 20 分間遠心することにより菌体 30 g を集菌し、これをリン酸緩衝液 (pH 7.4) を含む生理食塩液 (PBS) で 2 回洗浄後、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 200 ㎖ に懸濁した。この懸濁液を超音波処理してその中に含まれる菌体を破砕し、遠心分離によって不溶物を除き、得られた上清をマイコプラズマ・アルギニニ (*M. arginini*) の菌体抽出液とした。

上記で得られた固体抽出液を出発材料として、

(3) PEG-修飾アルギニンデイミナーゼの調製



(2)で調整したアルギンデイミナーゼ(25 mg)に0.1 M炭酸ナトリウム緩衝液(pH 9.0) 5 mlを添加し、37℃で30分間攪拌した。氷冷した1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0) 5 mlを添加し、反応を停止させた後、MX-50 (アミコン社、分子量5万カット)を用いた限外濾過により未反応の活性化PEGを除去した。得られたPEG修飾アルギンデイミナーゼについて、リン酸緩衝液(pH 7.4)を含む生理食塩水(PBS)に対して透析した後、収量、比活性およびアミノ基の修飾率を測

定した。

なお、蛋白定量は牛血清アルブミンを標準として通常のビウレット法により、酵素活性は生成したシトルリンをArchibaldの方法(J. Biol. Chem. 誌、155、121 (1944))により測定した。このとき、1分間に1 μ molのシトルリンを生産するアルギニンデヒドロゲナーゼ活性を1単位(U)とし、比活性は酵素1 μ g当たりの単位数(U/ μ g蛋白)で表わした。

また、PEG-修飾アルギニンデヒドロゲナーゼのアミノ基修飾率は未修飾アルギニンデヒドロゲナーゼを対照として2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)を用いたSatakeらの方法(J. Biochem. 誌、47、654 (1960))により測定した。

このときの結果を第2表に示す。

第 2 表	
項 目	数 値
収 量	16.0 (mg蛋白)
比活性	25.5 (U/ μ g蛋白)
アミノ基修飾率	5.1 (%)

中アミノ酸濃度の測定は、各アミノ酸をケイ光試薬(NBD-F4, フルオロー7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール)を用いて誘導体化したのち、高速液体クロマトグラフィーにより行った。

このときの結果を第3表に示す。

時 間	未修飾アルギニンデヒドロゲナーゼ (対照群)		PEG-修飾アルギニンデヒドロゲナーゼ (試験群)	
	シトルリン (μ M)	アルギニン (μ M)	シトルリン (μ M)	アルギニン (μ M)
投与前	177.0	68.4	242.0	77.6
投与後				
1日	0	253.1	0	291.0
3日	0	289.6	0	1245.9
8日	117.3	65.7	0	340.6
15日	91.3	135.5	36.8	109.9

実施例2

注射用酵素製剤の調製

実施例1-(3)で得られたPEG-修飾アルギニンデヒドロゲナーゼをPBSを用いて希釈し、濾過滅菌して25 U/ μ lの注射用酵素製剤を調製した。

なお、実施例1-(2)で得られた未修飾アルギニンデヒドロゲナーゼを実施例2と同様にして注射用酵素製剤を調製し、比較試験の対照として使用した。

試験例

マウスにおける血中安定性の向上

7週齢の雄性CDF₁マウス6匹を無作為に対照群3匹、試験群3匹に群分けした。そして、実施例2で調製した未修飾アルギニンデヒドロゲナーゼ製剤を対照群に、PEG-修飾アルギニンデヒドロゲナーゼ製剤を試験群に、それぞれ0.2 μ l (5U/マウス)ずつ尾静脈内に投与し、投与1日後、3日後、8日後および15日後に眼窩静脈より採血を行った。

各製剤の血中安定性は、血中アルギニン濃度とシトルリン濃度の経時変化を指標した。なお、血

特開平4-121187(6)

第1図-1

TCT CTA TTT CAC AGT AAA TTT AAA CCA ATT CAC GTT TAT TCA GAA ATT
Ser Val Phe Asp Ser Lys Phe Lys Gly Ile His Val Tyr Ser Glu Ala
1 5 10 15
GGT CAA TTA GAA TCA GTT CTA GTT CAC GAA CCA CCA GCG GAA ATT CAC
Gly Glu Leu Gly Ser Val Leu Val His Glu Pro Gly Arg Glu Ile Asp
20 25 30
TAT ATT ACA CCA GGT AGA CTA CAT CAA TTA TTA TTC TCA GGT ATC TTA
Tyr Ile Thr Pro Ala Arg Leu Asp Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ile Leu
35 40 45
GAA AGC CAC GAT GGT AGA AAA GAA CAC AAA CAA TTC CTA CCA GAA TTA
Glu Ser His Asp Ala Arg Lys Glu His Lys Glu Phe Val Ala Glu Leu
50 55 60
AAA CCA AAC GAC ATC AAT GTT CTT GAA TTA ATT GAT TTA GTT CCT GAA
Lys Ala Asn Asp Ile Asn Val Val Glu Leu Ile Asp Leu Val Ala Glu
65 70 75 80
ACA TAT GAT TTA GCA TCA CAA GAA GGT AAA GAC AAA TTA ATC GAA
Thr Tyr Asp Leu Ala Ser Glu Glu Ala Lys Asp Lys Leu Ile Glu
85 90
TTT TTA GAA CAC TCA GAA CCA GTT CTA TCA GAA CAC AAA GTA GTT
Phe Leu Glu Asp Ser Glu Pro Val Leu Ser Glu Glu His Lys Val Val
100 105 110
CTA ACA AAC TTC TTA AAA GGT AAA AAA AAT TCA ACG GAA TTA CTA GAA
Val Arg Asn Phe Leu Lys Ala Lys Lys Tyr Ser Arg Glu Leu Val Glu
115 120 125
ATC ATC ATC CCA GCG ATC ACA AAA TAC GAT TTA GGT ATC CCA CCA CAT
Ile Met Met Ala Gly Ile Thr Lys Tyr Asp Leu Gly Ile Glu Ala Asp
130 135 140

この結果、試験群では対照群にくらべて血中のアルギニン濃度が長期間に亘り低減し、シトルリン濃度が増加しているため、PEG-修飾アルギニンデイミナーゼは血中で長期間安定にその作用を保持すると判断される。

(発明の効果)

本発明のポリエチレングリコール修飾アルギニンデイミナーゼは、アルギニンデイミナーゼと同等の制癌活性を示し、しかも血中安定性が向上し、抗原性が減少し、しかも低毒性であるため副産物として有用に利用することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明に好適に用いられるアルギニンデイミナーゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列及びその塩基配列を示す。

出願人 日本紅薬株式会社
代理人 藤野清也
代理人 宮田広豊

第1図-2

CAC GAA TTA ATC GTT CAC CCA ATC CCA AAC CTA TAC TTC ACA GGT CAC
His Glu Leu Ile Val Asp Pro Ser Pro Asn Lys Tyr Phe Thr Arg Asn
145 150 155 160
CCA TTT CCA TCA GTA GGT AAT GGT CTA ACA ATC CAC TAC ATC GGT TAC
Pro Phe Ala Ser Val Gly Asn Gly Val Thr Ile His Tyr Met Arg Tyr
165 170 175
AAA GTT ACA GAA GGT CAA ACA TTA TTC TCA AGA TTT CTA TTC TCA AAT
Lys Val Arg Glu Arg Glu Thr Leu Phe Ser Arg Phe Val Phe Ser Asn
180 185 190
CAC GGT AAA CTA ATG AAT CCA TCA TAC TAC CAC GGT TCA CTA AAA
His Pro Leu Asn Ile Asn Thr Pro Trp Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
195 200 205
TTA TCA ATC GAA GGT GCG GAC CTA TTT ATC TAC AAC AAT CAC ACA TTA
Leu Ser Ile Glu Gly Gly Asp Val Phe Ile Tyr Asn Asn Asp Thr Leu
210 215 220
CTA GTT GGT GTT TCT GAA ACA AAT CAC TTA CAA ACA GTT AAT TTA TTA
Val Val Gly Val Ser Glu Arg Thr Asp Leu Glu Thr Val Thr Leu Leu
225 230 235 240
GGT AAA AAC ATT GTT GGT AAT AAA GAA TGT CAA TTC AAA GGT ATT GTT
Ile Leu Asn Ile Val Ile Asn Lys Glu Cys Glu Phe Lys Arg Ile Val
245 250 255
GCA ATT AAC GTT CCA AAA TCA ACA AAC TTA ATC CAC TTA GCA ACA TCA
Ala Ile Asn Val Pro Lys Trp Thr Asn Leu Met His Leu Asn Tyr Trp
260 265 270
CTA ACA ATC TTA CAC AAC GAC AAA TTC CTA TAC TCA CCA ATC GGT AAT
Leu Thr Met Leu Asp Lys Asp Lys Phe Asn Tyr Ser Pro Ile Ile Asn
275 280 285
CAC CTA TTT AAA TTC TCA GAT TAT CAC TTA CTA AAC GGT CCA CCA GAA
Asp Val Phe Lys Phe Trp Asp Tyr Asn Leu Val Asn Gly Gly Ala Glu
290 295 300

第1図-3

CCA CAA CCA GTT CAA AAC GGA TTA CCT CTA GAA CCA TTA TTA CAA TCA
Pro Glu Pro Val Glu Asn Gly Leu Pro Leu Glu Gly Leu Leu Glu Ser
305 310 315 320
ATC ATT AAC AAA AAA CCA GTT TTA ATT CCT ATC CCA GGT CAA GGT GGT
Ile Ile Asn Lys Lys Pro Val Leu Ile Pro Ile Ala Gly Gly Gly Ala
325 330 335
TCA CAA ATC GAA ATC GAA AGA GAA ACA CAC TTC CAT GGT ACA AAC TAC
Ser Glu Met Glu Ile Glu Arg Glu Thr His Phe Asp Gly Thr Asn Tyr
340 345 350
TTA CCA ATT ACA CCA GGT GTT CTA ATT GGT TAC TCA GGT AAC GAA AAA
Leu Ala Ile Arg Pro Gly Val Val Ile Gly Tyr Ser Arg Asn Glu Lys
355 360 365
ACA AAC GGT GGT CTA GAA GGT CCA GCG ATT AAA GTT GTT CCA TTC CAC
Thr Asn Ala Ile Leu Glu Ala Ala Gly Ile Lys Val Leu Pro Phe His
370 375 380
GGT AAC CAA TTA TCA TTA GGT ATC GGT AAC GGT GGT TGT ATC TCA ATC
Gly Asn Glu Leu Ser Leu Gly Met Gly Asn Ala Arg Cys Met Ser Met
385 390 395 400
CCT TTA TCA GGT AAA GAT GTT AIG TCA
Pro Leu Ser Arg Lys Asp Val Lys Trp
405